

⑫ 公表特許公報(A)

平5-502581

⑬ 公表 平成5年(1993)5月13日

⑭ Int. Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 審査請求 未請求
C 12 N 5/06 7236-4B C 12 N 5/00 予備審査請求 有 部門(区分) 1(1)
7236-4B 7/00 E
※
(全 8 頁)

⑮ 発明の名称 付着的に結合した細胞を有するマトリックスおよびウイルス/ウイルス抗原の製造方法

⑯ 特 願 平3-501132

⑰ 翻訳文提出日 平4(1992)6月22日

⑱ 出 願 平2(1990)12月21日

⑲ 国際出願 PCT/AT90/00128

⑳ 国際公開番号 WO91/09935

㉑ 国際公開日 平3(1991)7月11日

優先権主張 ㉒ 1989年12月22日 ㉓ オーストリア(AT) ㉔ A2928/89

⑳ 発 明 者 ムント、ヴォルフガング オーストリア共和国、アー-1080グイーン、フロリアンガツセ57

／6番

㉕ 出 願 人 イムノ・アクチエンゲゼルシャフト オーストリア共和国、アー-1221グイーン、インダストリーシュト
ラーセ67番

㉖ 代 理 人 弁理士 青山 茂 外2名

㉗ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許), SU, US

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. ウイルスに感染したヒトまたは動物細胞が付着的に結合して
いるウイルス/ウイルス抗原製造のためのマトリックス。

2. 付着的に結合している細胞としてVero細胞ATCC CCL

81が用いられていることを特徴とする請求項1のマトリッ
クス。

3. 付着的に結合している細胞がダニによって媒介される脳炎(T
BE)ウイルスに感染していることを特徴とする請求項1または2
のマトリックス。

4. 付着的に結合している細胞がフラビウイルスまたはアレナウ
イルスに感染していることを特徴とする請求項1または2のマトリ
ックス。

5. ガラス、交差結合デキストラン、ゼラチンまたは合成物質か
らなることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載のマトリッ
クス。

6. マイクロキャリアーとして設計されていることを特徴とする

請求項5のマトリックス。

7. その表面1cm²あたり1×10⁵～4×10⁶個の細胞が付
着的に結合していることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項、
またはそれ以上に記載のマトリックス。

8. 請求項1～3または5～7のいずれかに記載のマトリックス
を用いるダニに媒介される脳炎(TBE)ウイルス抗原の製造方法
であって、表面依存性永久細胞、好ましくはVero細胞ATCC
CCL 81にTBEウイルスを接種し、細胞を、細胞内での抗原
の生成が維持され抗原が培養に分泌されるよう、生存性を保ちなが
ら、血清不含培養中のマトリックスに付着的に結合させたまま維持
し、そこで抗原含有培養を担体-結合細胞から分離し、製剤的に許
容される既知の方法で濃縮、不活化および精製により処理すること
を特徴とする方法。

9. ウイルス増殖および抗原生成を連続的に操作される連続反応
装置で少なくとも5日間、34～37℃の温度で行うことを特徴と

する請求項8の方法。

10. 菌液を菌液濃度0.3-10 μ g/v/vで行うことを特徴とする請求項9の方法。

11. 濾液リアクター内で、発酵容量1Lあたり、 2×10^8 - 2×10^{10} 細胞の細胞密度（該菌は連続フローフェメンターによる）が得られることを特徴とする請求項9の方法。

12. 培養内の抗原濃度1-10 μ g/mlが維持されることを特徴とする請求項8-11のいずれか1項または数項の方法。

炎ウイルス、に対する不活化ワクチンがこれまでに利用可能となっている。これらのワクチンは感染マウスの脳から回収、精製され、安全かつ有効であることが確かめられている[ホークら (Boke et al.), N. Engl. J. Med. 319, 608 (1988)]。

1976年以降、TBEワクチンが利用可能となり、保健機関によって承認されている。このワクチンを製造するには感染した赤ん坊マウスの脳でウイルスを培養し、ニワトリ胚細胞内で増殖させ、ホルマリンで不活化した後、有効な精製法に付すことからなる [ハインツら (Heinz et al.), J. Med. Virol., 6, 103(1980)]。

文献にはワクチンの製造の可能性という観点から、多くのアルボウイルス類を増殖し得る方法が記載されている。今日最も多く用いられている方法はニワトリ胚線維芽細胞にマウス脳から回収したTBEシード（種）ウイルスを接種し、接種された細胞を培養することからなる。この方法では、ワクチン接種をされるべきヒトに、得られたワクチンの接種量を繰り返し接種したとき副作用が起きないよう、複雑な異種の生物学的物質を除去するために、抗原を複雑

付着的に結合した細胞を有するマトリックスおよび

ウイルス/ウイルス抗原の製造方法

本発明は付着的に結合したヒトまたは動物細胞を有する細胞マトリックス、並びにウイルス/ウイルス抗原の製造方法、とりわけダニによって媒介される脳炎（TBE）ウイルスのウイルス抗原の製造方法に関する。

ヨーロッパにおけるTBEウイルス感染は、第2次世界大戦当時から観察されている。オーストリア、南ドイツ、及びチェコスロバキアでは、毎年、数百人の患者が定期的にTBE感染の治療を受けている。TBEウイルスはアルボウイルス(arbovirus)の早期血清学的グループBのフラビウイルス(flavivirus)群に分類されており、トガビリダエ (Togaviridae)ウイルス群の遺伝子を有する。

最も重要かつ最も頻繁に起きるヒトの脳炎病原体の1つ、日本脳

な方法で精製する必要がある。

ニワトリ胚細胞を得るためには、SPF（特異病原体を含まない=specific pathogen free）卵から出発する必要がある。また、そのSPF状態を維持するために、使用前にこれらのSPF卵を膨大な回数、時間のかかる試験に付す必要がある。

さらに、ニワトリ胚細胞培養は少ない世代数しか連続培養できず、従ってパッチサイズに制限があり、1次培養を感染状態に保つことが困難であり、ウイルス増殖および抗原生産に関する1次細胞の質は一定でなかった。

これらの不利はTBEウイルス抗原の製造方法のみならず、広く抗原一般の製造方法に存在している。

本発明は上記の不利が解消されたウイルス/ウイルス抗原、特にTBEウイルス/ウイルス抗原の製造方法の改良、ならびに、特に大量生産を可能ならしめる細胞培養におけるウイルス/ウイルス抗原の増殖方法であって、同時に簡単な方法で培養を無菌状態に維持することができる方法を提供することを目的とするものである。

さらに、望ましくない細胞タンパク質の培養上清への混入を最小限にする。

上記の目的を達成するために、マトリックス、即ち担体マトリックスであってそれに付着的に結合しているウイルスに感染したヒトまたは動物細胞を有する担体マトリックス、を提供する。本発明はウイルス増殖に適した表面一依存性細胞がウイルスに感染した状態でもマトリックスに付着的に結合したままであって、かなりの長期間、連続してウイルス抗原を産生し、培養培地に分泌するという所見に基づいている。

本発明のマトリックスは感染細胞を保持したまま数日間、0℃から8℃の間で、即ち細胞の代謝、即ちウイルス生産が停止する条件下で、保管することができる。その後、このようにして停止したマトリックスを培養培地に入れ、個々の増殖条件を調節することでウイルス生産に問題なく用いることができる。このように本発明のマトリックスは、その無害状態のチェックが容易であり、任意の時にウイルス抗原の製造に用いることができる、一定の質と活性を持つ

μsから3000μsの範囲のマイクロキャリアーとして形成されたマトリックスが最良である。これらのマイクロキャリアーは平滑表面または多孔性表面のいずれを有するものでもよい。

さらに好ましい態様では、本発明のマトリックスは、その表面面積 (cm²) あたり $1 \times 10^5 - 4 \times 10^8$ 個の細胞が付着的に結合していることを特徴とする。

本発明はまた、本発明のマトリックスを用いるTBEウイルス抗原の製造方法であって、表面依存性永久細胞、好ましくはVero細胞ATCC CCL 81にTBEウイルスを接種し、細胞を、細胞内での抗原の生成が維持され抗原が培地に分泌されるよう、生存性を保ちながら、血清不含培地中のマトリックスに付着的に結合させたまま維持し、そこで抗原含有培地を担体-結合細胞から分離し、製剤的に許容される (galenically accepted)、既知方法で濃縮、不活化および精製により処理することを特徴とする方法に関する。

Vero細胞株ATCC CCL 81は、ドリザル (Cercopithecus aethiops) の腎組織から得られ、血清不含培地で代数的に活性に

ストックとして製造され得る培養出発物質を構成するものである。

抗原-生産細胞の担体 (キャリアー) への結合はまた、生産に備えたウイルス感染細胞の取り扱いを極めて簡単にする。即ち、例えばウイルス/ウイルス抗原の生産を灌流リアクター (反応器) によって連続的に行うことができる。抗原含有培養からの細胞の分離は、それがマトリックスに結合していることで実質上容易になり、その結果、本発明のマトリックスはウイルス/ウイルス抗原の商業規模での製造を簡単にするものである。

好ましい態様では、本発明のマトリックスは付着的に結合する細胞としてVero細胞ATCC CCL 81を用い、これを好ましくはTBEウイルス抗原の製造、即ちTBEウイルスに感染させて用いる。

しかしながら、マトリックスに付着的に結合した細胞をフラビウイルスまたはアレナウイルスに感染させてもよい。

マトリックスの原料として、ガラス、交差結合デキストラン、ゼラチンまたは合成物質が適当であるが、粒子径が好ましくは100

維持される。そのような永久細胞株のために、マザーシードセルバンク (mother seed cell bank) およびワーキングシードセルバンク (working seed cell bank) が開始され、不純物のための全試験が行われた。この永久細胞株は単にそれが混在細胞を含まないことのみならず、その培養行動、出発培養、増殖行動によっても正確に特徴付けられ、一度最適条件に調節すると一定であると考えられる。

本発明方法によれば、好ましくはマイクロキャリアーに結合したVero細胞を用いる。その結果、本明細書で用いる1次細胞培養を用いて、高細胞密度が、Rouxフラスコ内または懸濁液としてでなく、達成されそれにより発酵 (培養) 容量あたりのウイルスおよびウイルス抗原量の相当な増大が可能となる。

本発明方法の優れた態様ではウイルス増殖および抗原生成を連続操作される灌流反応装置で少なくとも5日間、34~37℃の温度にて、灌流速度0.3-10 v/v/日で行う。さらに、灌流反応装置では発酵 (培養) 容量1Lあたり、 $2 \times 10^5 - 2 \times 10^8$ 個の細胞密度 [後者はフルイッドベッドファーマンター (fluidize

特表平5-502581 (4)

d bed fermenter)による]に達し得る。

本発明の灌流培養によるウイルス増殖法はバッチ培養に比較して培養中でのウイルスおよびウイルス抗原の、一度濃度依存性—居住時間(dwell time)を實質上、減少することができる。居住時間が短縮される程、熱不活化が少なくなり、本発明方法の高生産性に至る。即ち、灌流培養地で抗原濃度 $1-10 \mu\text{g}/\text{el}$ が達成され、維持される。

本発明方法によれば、培養のための最適条件は単純な方法で調節できる。さらに従来法に比較してその実施に要する操作数が實質上少なく、感染性物質の取り扱いがより安全であって、培養からのウイルスおよびウイルス抗原の処理を連続的かつ迅速に行うことができる。

以下に、ウイルス接種物の製造、ウイルスおよびウイルス抗原の製造のための細胞の培養、およびそのまゝのウイルスおよびウイルス抗原の製造をさらに詳しく説明する。

1. ウイルス接種物

シードセルを有するMCを細胞密度が $1 \times 10^3-4 \times 10^3/\text{cm}^2$ になるまで 37°C で培養する。通常、6日後にこの細胞密度に達する。培養期間中、マイクロキャリアーに細胞を完全に過剰増殖させ、最後に個々のマイクロキャリアーをそれぞれの表面に付着する細胞シートを介してまとめるよう培養する。

3. ウイルス/ウイルス抗原製造

指定の細胞密度に達したとき、MCに結合した細胞をウイルス接種物で感染させ($1-0.01 \text{ p.f.u.}/\text{細胞}$ 、好ましくは $0.1 \text{ p.f.u.}/\text{細胞}$)本発明のマトリックスを得る。本発明のマトリックスは $0-8^\circ\text{C}$ の間で数日間保管でき、ウイルス抗原の製造のために即座に用いることができる。

抗原の製造のためには感染細胞を有するMCを灌流反応装置に入れる。ウイルス感染進行のこの時点から、マイクロキャリアー上で培養された細胞を保持装置によって反応装置内に維持しつつ、血清不含有地のみを用い、該培養地を灌流反応装置を介して連続的にポンプで送りながら培養する。感染後2日目から始めて少なくとも10

細胞(例、Vero ATCC CCL 81)をローラー(Roller)フラスコ内で 37°C において全面成長に達するまで培養し、シード(種)ウイルス懸濁液 1 el を接種する。感染後2日目から開始し、毎日、地の $1/2$ を血清不含有地で置換する。4日目から8日目までの培養上清は 1 el あたり $2-5 \times 10^6 \text{ p.f.u.}$ を有し、これを -20°C でウイルス接種に用いるまで保存する。

2. ウイルス/ウイルス抗原製造のための細胞培養

液体窒素に保存したATCC CCL 81ワーキングシードセル(working seed cell)を出発物質として用い、これらの細胞をファーメンターへの接種のための量の細胞が得られるまで組織培養フラスコで培養する。付着的に増殖するワーキングシードセルの付着のために、できるだけ多くの表面が得られるよう、細胞をさらに発酵装置内で 37°C で培養し続ける。そのような大量の表面はガラス製またはポリスチレン製のrollerフラスコまたはマイクロキャリアー(MC)を用いて得られる。サイズ $170 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$ の交差結合デキストランのMCが最適である。

日間は高濃度のウイルス抗原が存在し、連続的にそこから回収される。

以下に実施例を挙げ、本発明方法をさらに詳しく説明する。全実施例において、抗原—ウイルス抗原を抗原—ELISAによって測定した。

実施例1

Vero細胞ATCC CCL 81を6Lファーメンター中、マイクロキャリアー上(Cytodex 3, Pharmacia)で 37°C において細胞数が $2 \times 10^6/\text{el}$ 培養地(DMEM=ダルベッコのイーグル培養地)に達するまで培養し、以下のいずれかに付す。

a) これにTBEウイルス($0.1 \text{ p.f.u.}/\text{細胞}$)を感染させ、バッチ内でウイルスを増殖させる。

表 1

感染後の日数	ウイルス/ウイルス抗原($\mu\text{g}/\text{ml}$)
2	0.20
3	0.70
4	1.60
5	2.70
6	4.00
7	3.80
8	2.90

発酵容量1Lあたりのウイルス/ウイルス抗原の生産量は4 μg に達した。

b) これにTBEウイルス(0.1pfu/細胞)を感染させ、培養培地を0.5容量/ファーマンター容量/日で連続的に増液する。

表 2

感染後の日数	ウイルス/ウイルス抗原($\mu\text{g}/\text{ml}$)
2	0.30
3	1.60
4	4.50
5	4.50
6	2.50
7	3.20
8	2.90
9	2.50
10	2.30

発酵容量1Lあたりのウイルス/ウイルス抗原の生産量は13.7 μg に達した。

c) これにTBEウイルス(0.1pfu/細胞)を感染させ、培養培地(DMEM)を1容量/ファーマンター容量/日で連続的に増液する。

表 3

感染後の日数	ウイルス/ウイルス抗原($\mu\text{g}/\text{ml}$)
2	0.45
3	1.40
4	2.00
5	2.00
6	1.70
7	1.60
8	1.10
9	1.10
10	0.90

発酵容量1Lあたりのウイルス/ウイルス抗原の生産量は12.4 μg に達した。

実施例 2

Vero細胞(ATCC CCL 81)を40Lファーマンター中、マイクロキャリア上(Cytodex 3、Pharacia)で37℃に

おいて細胞数が $2 \times 10^8/\text{ml}$ になるまで培養増殖し、TBEウイルス(0.1pfu/細胞)感染後、培地(DMEM)で連続的に増液した(0.33容量/ファーマンター容量/日)。

表 4

感染後の日数	ウイルス/ウイルス抗原($\mu\text{g}/\text{ml}$)
2	1.60
3	3.50
4	5.00
5	4.30
6	4.00
7	2.90
8	2.70
9	2.10
10	2.00

発酵容量1Lあたりのウイルス/ウイルス抗原の生産量は10.7 μg に達した。

実施例3

Vero細胞(ATCC CCL 81)を40Lファーマンター
中、マイクロキャリア上(Cytodex 3, Pharmacia)で37℃に
おいて細胞数が 3×10^6 /slになるまで培養増殖、TBEウイル
ス(0.1pfu/細胞)感染後、培地(DMEM)で連続的に増殖し
た(1容量/ファーマンター容量/日)。

表 5

感染後の日数	ウイルス/ウイルス抗原(μ g/sl)
2	1.10
3	3.80
4	3.90
5	3.00
6	2.30
7	2.20
8	2.00
9	3.15**
10	2.30

** : 増殖速度は0.5容量/ファーマンター容量/日に下げた。

発酵容量1Lあたりのウイルス/ウイルス抗原の生産量は21.7g
gに達した。

実施例4

Vero細胞(ATCC CCL 81)を150Lファーマンタ

ー中、マイクロキャリア上(Cytodex 3, Pharmacia)で37℃
において細胞数が 2×10^6 /slになるまで培養増殖、TBEウイル
ス(0.1pfu/細胞)感染後、培地(DMEM)で連続的に増殖
した(0.33容量/ファーマンター容量/日)。

7gに達した。

表 6

感染後の日数	ウイルス/ウイルス抗原(μ g/sl)
2	0.20
3	1.90
4	2.40
5	4.80
6	5.40
7	4.10
8	4.40
9	3.20
10	4.50

発酵容量1Lあたりのウイルス/ウイルス抗原の生産量は14

特表平5-502581 (7)

方法で濃縮、不活化および精製することにより製剤的に許容し得る

膜剤に加工する。

ウイルス／抗原の製造方法

本発明は、付着的に結合した、ウイルスに感染したヒトまたは動物細胞を有するマトリックス、即ち宿主マトリックスに関する。ウイルス増殖に適した表面一依存性細胞がウイルスに感染した状態で、マトリックスに付着的に結合したままであって、かなりの長期間連続してウイルス抗原を産生し、培養増殖に分泌するということが判明した。

ダニによって媒介される肝炎（TBE）ウイルスを細胞培養中で増殖させることによりTBEウイルス抗原を生産するために、表面依存性永久細胞、好ましくはVero細胞ATCC CCL81にTBEウイルスを接種し、抗原の生成を維持する様に、細胞を、細胞の増殖を保持しながら、非溶菌性の血清不含系で抗体に結合させたまま維持し、そこで抗原含有増培を抗体-結合細胞から分離し、既知

國 際 詞 彙 報 告

[illegible]

國際調查報告

AT 9000128
SA 62977

The views from the second family members relating to the person mentioned in the above-mentioned operational search report. The members are as contained in the European Patent Office (EPO) file no. 23/86/91. The European Patent Office is in no way liable for these particular search and merely given for the purpose of information.

Patent document related to search report	Publication date	Patent family members/7	Publication date
GB-A- 2059991	29-04-81	SC-B- 445116 OE-A, C 3033805 FR-A, B 2444984 JP-B 1054992 JP-A 56051981 SE-A 7907573	02-06-86 02-04-81 20-03-81 21-11-89 09-05-81 13-03-81
FR-A- 2444466	18-07-80	AT-A- 358167 BE-A- 880732 CH-A 444271 DE-A, C 2950004 GB-A, B 2038179 SE-B 447789 SE-A 7910054 SU-A 1318149	25-08-80 16-04-80 31-07-84 03-07-80 23-07-80 15-12-86 23-06-80 15-06-87
GB-A- 2094832	22-09-82	BE-A- 892479 CA-A 1172565 CH-A 662363 DE-A, C 3209058 FR-A, B 2501715 JP-C 1313474 JP-A 57202289 JP-B 60036111 SE-B 432335 SE-A 8201555 US-A 4495828	01-07-82 14-08-84 30-09-87 04-11-82 17-09-82 28-04-86 13-12-82 30-08-85 23-11-87 14-09-82 22-01-85
EP-A- 0066726	15-12-82	CA-A- 1187433 JP-A 57194785 SE-A 8105328	21-05-85 30-11-82 20-11-82
GB-A- 2151610	24-07-85	CA-A 1206900 DE-A 3341772 FR-A 2515669 GB-A, B 2112377 SE-B 452892 SE-A 8300990	01-07-86 30-05-85 24-08-87 20-07-83 21-12-87 24-08-84

* For more details about this survey : see Official Journal of the European Patent Office, No. 1268

国際調査報告

AT 9200128
SA 42977

This document contains the patent family members relating to the patent documents used in the above-mentioned international search report.
The documents are as contained in the European Patent Office (EPO) file on 12/04/94.
The European Patent Office is to be very grateful for their assistance which are hereby given for the purpose of information.

Patent document used in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
EP-A- 0239648	07-10-87	JP-1- 63501474 WO-A- 8702056	05-06-88 05-04-87

For more details about this patent, see Official Journal of the European Patent Office, No. 17A1

第1頁の続き

⑨Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号
C 12 N 7/00		7236-4B
C 12 P 21/00		8214-4B
// A 61 K 39/00	B	8413-4C
	G	8413-4C
(C 12 P 21/00		
C 12 R 1:91)		

⑩発明者 バレット, ノエル

オーストリア共和国、アー-3400 クロースターノイブルク/ヴァ
イトリンク、シュティンヴァントガツセ6アー番

⑪発明者 ドルナー, フリードリヒ

オーストリア共和国、アー-1230グイーン、ペーターリンガツセ17
番

⑫発明者 アイブル, ヨハン

オーストリア共和国、アー-1180グイーン、グスタフ・ツエルマー
クガツセ2番